

**Method for obtaining active beta-NGF**

Patentnummer: ☐ EP0994188  
Bekendtgørelsesdato: 2000-04-19  
Opfinder(e): GROSSMANN ADELBERT DR (DE); RUDOLPH RAINER DR (DE); SCHWARZ ELISABETH (DE); RATTENHOLL ANKE (DE)  
Patenthaver(e): RUDOLPH RAINER DR (DE)  
Ønsket Patent: ☐ WO0022119  
Ansøgningsnummer: EP19980119077 19981009  
Prioritet(er): EP19980119077 19981009  
IPC Klasse: C12N15/12; C07K14/48  
EC Klasse: C07K14/48  
Tilsvarende: AU1034800, BR9914393

**Sammendrag**

Preparation of biologically active beta-NGF comprises denaturing its inactive insoluble proform followed by renaturation and pro-sequence cleavage. Preparation of biologically active beta -NGF from its inactive insoluble proform, obtained by recombinant preparation in prokaryotic cells comprises: (a) dissolving ProNGF in its inactive insoluble form in a denaturing solution ; (b) transferring into a non- or weak denaturing solution where the denatured proNGF assumes a biologically active conformation, determined by the presence of disulfide bridges occurring in natural beta -NGF; and (c) cleaving the pro-sequence to obtain the active beta -NGF followed by its isolation.

-----  
Data fra esp@cenet test databasen - l2

## Beskrivelse

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Gewinnung von beta -NGF durch Naturierung von denaturiertem, inaktiven proNGF und Abspaltung der Prosequenz.

[0002] Nervenwachstumsfaktor ( beta -NGF) ist ein neurotropher Faktor, der für das Wachstum und das Überleben von sympathischen und sensorischen Neuronen notwendig ist (R. Levi-Montalcini, Science 237, 1154 (1987); H. Thoenen und Y.-A. Barde, Physiol. Rev. 60, 1284 (1980); B. A. Yankner und E. M. Shooter, Annu. Rev. Biochem. 51, 845 (1982)). beta -NGF unterstützt ausserdem Wachstum, Differenzierung und Vitalität cholinergischer Neuronen des zentralen Nervensystems (F.J. Hefti, J. Neurobiol. 25, 1418 (1994)). Mögliche therapeutische Indikationen für rekombinanten menschlichen Nervenwachstumsfaktor beinhalten periphere sensorische Neuropathien, z.B. bei Diabetes oder als mögliche Nebenwirkung bei der AIDS-Therapie. Weitere Indikationen für rh- beta -NGF stellen zentrale Neuropathien, z.B. die Alzheimersche Krankheit dar. Der Gedächtnisverlust wird hier durch den Verlust cholinergischer Neuronen hervorgerufen.

[0003] Menschlicher beta -NGF wird als Präpro-Protein translatiert. Dieses besteht aus 241 Aminosäuren. Das Präpeptid (18 Aminosäuren) wird bei der Translokation ins endoplasmatische Retikulum (ER) abgespalten, das entstandene Proprotein wird anschliessend N- und C-terminal prozessiert (Abspaltung der Prosequenz (103 Aminosäuren) und der letzten beiden Aminosäuren). Reifer humaner NGF besteht folglich aus 118 Aminosäuren. Er ist homolog zum Maus- beta -NGF und unterscheidet sich von diesem Protein lediglich durch 12 Aminosäureaustausche. Für die Durchführung klinischer Studien oder einen möglichen Einsatz als Therapeutikum müssen grosse Mengen homogenen beta -NGFs verfügbar sein. Eine natürliche Quelle grösserer Mengen dieses Faktors sind die Submaxillardrüsen männlicher Mäuse. Diese Präparationen sind jedoch heterogene Gemische verschiedener Dimerer und daher für einen therapeutischen Einsatz ungeeignet. Ausserdem ist es wünschenswert, Patienten die humane Form des Proteins zu verabreichen. Neurotrophe Faktoren sind aber nur in verschwindend geringen Konzentrationen im menschlichen Gewebe vorhanden.

[0004] Für den Einsatz von beta -NGF als Therapeutikum kommt deshalb nur die rekombinante Herstellung in Betracht. Hier bieten sich zwei Möglichkeiten an: die rekombinante Expression entweder in Zellkultur oder in Bakterien. Eukaryotische Zellexpressionssysteme liefern jedoch nur sehr geringe Proteinmengen und sind verhältnismässig teuer (J. Barnett et al., J. Neurochem. 57, 1052 (1991); C. H. Schmelzer et al., J. Neurochem. 59, 1675 (1992) ; R. H. Edwards und W. J. Rutter, United States Patent No. 5,683,894).

[0005] Im Gegensatz dazu werden mit prokaryotischen Expressionssystemen grosse Mengen des gewünschten Proteins erhalten. Bakterien sind jedoch im Gegensatz zu den eukaryotischen Expressionssystemen nicht in der Lage, die Vorläuferproteine korrekt zu prozessieren. Die Produktion rekombinanten beta -NGFs führt in Bakterien, wie häufig bei der Expression von rekombinanten Säugergenen, zum biologisch inaktiven Translationsprodukt, welches dann in aggregierter Form in der Zelle abgelagert wird (sog.

Inclusion Bodies  
, (IBs)).

[0006] Die Naturierung von reifem beta -NGF aus derartigen Inclusion Bodies gelingt jedoch nur bei sehr geringen Proteinkonzentrationen (unter 10 µg/ml) und bei sehr geringen Ausbeuten (bis ca. 10 %). Solche Verfahren sind beispielsweise beschrieben in der EP-A 0 544 293, US-Patent 5,606,031, US-Patent 5,235,043 und WO 97/47735. Eine Naturierung über eine Sulfitylyse von neurotrophen Faktoren der NGF/BDNF-Familie wird in der WO 95/30686 beschrieben.

[0007] In der WO 97/47735 wird ein verbessertes Verfahren zur Naturierung von Proteinen beschrieben. In diesem Verfahren wird das inaktive Protein mit einer Lösung eines Denaturierungsmittels in einer denaturierenden Konzentration in Gegenwart einer niedermolekularen Substanz, welche Thiolgruppen enthält, gelöst. Das gelöste Protein wird anschliessend aus der stark denaturierenden Lösung in eine nicht oder nur schwach denaturierende Lösung überführt, in welcher es eine biologisch aktive Konformation annimmt, wobei die Disulfidbindungen mit der Thiolkomponente gelöst werden und im Protein intramolekular in der Weise neu gebildet werden, dass das Protein eine Konformation einnimmt, die biologische Aktivität aufweist. Mit einem solchen verbesserten Verfahren kann für beta -NGF eine Naturierungsausbeute von ca.10% erhalten werden.

[0015] Die Konzentration des Denaturierungsmittels ist von der Art des Denaturierungsmittels abhängig und für einen Fachmann ohne weiteres feststellbar. Die Konzentration des Denaturierungsmittels (denaturierende Konzentration) ist dann ausreichend, wenn eine vollständige Solubilisierung des denaturierten schwer löslichen Proteins erreicht werden kann. Für Guanidiniumhydrochlorid liegen

diese Konzentrationen üblicherweise bei 3-8 mol/l, vorzugsweise 5 - 7 mol/l. Für Harnstoff liegen die Konzentrationen üblicherweise bei 6-10 mol/l. Unter einer schwach denaturierenden Lösung ist eine Lösung zu verstehen, welche ein Denaturierungsmittel in einer Konzentration enthält, welche die Verknüpfung der korrekten Disulfidbrücken im Protein und damit die Ausbildung der natürlichen Tertiärstruktur des Proteins ermöglicht. Vorzugsweise unterscheiden sich stark und schwach denaturierende Lösungen in der Konzentration um den Faktor 100 oder mehr.

[0016] Zur vollständigen Monomerisierung der Inclusion Body Proteine ist es weiterhin vorteilhaft, während der Solubilisierung zusätzlich ein Reduktionsmittel wie Dithiothreitol (DTT), Dithioerythritol (DTE) oder 2-Mercaptoethanol in einer Konzentration von 10-400 mM, besonders bevorzugt in einer Konzentration von 20-100 mM zuzusetzen.

[0017] Nach der Solubilisierung wird vorzugsweise gegen eine Lösung, welche ein Denaturierungsmittel in einer denaturierenden Konzentration enthält, dialysiert, um ggf. eingesetztes Reduktionsmittel zu entfernen. Zweckmässig enthält die Lösung, gegen die dialysiert wird, das Denaturierungsmittel in der gleichen Konzentration wie die Denaturierungslösung.

[0018] Die anschliessende Naturierung nach dem erfindungsgemässen Verfahren wird im neutralen bis alkalischen pH-Bereich durchgeführt, vorzugsweise zwischen pH 7 und 10, besonders bevorzugt im pH-Bereich zwischen 7.5 und 9.5. Als Pufferlösungen sind alle üblichen Puffer geeignet. Vorzugsweise werden dem Fachmann bekannte Puffer, wie z.B. Tris- oder Phosphatpuffer, als Renaturierungspuffer verwendet. Zur Überführung des denaturierten Proteins in Renaturierungspuffer wird das solubilisierete Protein in den Renaturierungspuffer verdünnt oder gegen Renaturierungspuffer dialysiert. Dadurch wird das Denaturierungsmittel ebenfalls in seiner Konzentration so weit verdünnt (schwach denaturierende Lösung), dass eine weitere Denaturierung des Proteins nicht mehr erfolgt. Bereits während der anfänglichen Erniedrigung der Konzentration des Denaturierungsmittels kann ein Naturierungsprozess erfolgen. Die Bedingungen für die Überführung des Proteins in die nicht oder schwach denaturierende Lösung müssen so gewählt sein, dass das Protein im wesentlichen in Lösung bleibt. Zweckmässig kann dies durch eine langsame kontinuierliche oder eine schrittweise Verdünnung erfolgen. Dabei ist es bevorzugt, das Denaturierungsmittel so zu verdünnen, dass eine möglichst vollständige Naturierung des Proteins erfolgt, oder das Denaturierungsmittel beispielsweise durch Dialyse nahezu vollständig zu entfernen.

[0019] Die Naturierung erfolgt vorzugsweise in Gegenwart von niedermolekularen Hilfsstoffen, welche die Ausbeute bei der Naturierung positiv beeinflussen. Derartige Hilfsstoffe sind beispielsweise in R. Rudolph et al., US Patent 5,593,865 beschrieben. Besonders bevorzugt wird als niedermolekularer Hilfsstoff bei der Naturierung Arginin verwendet, zweckmässig in einer Konzentration von 0.2 bis 1.5 M.

[0020] Die Naturierung nach dem erfindungsgemässen Verfahren erfolgt vorzugsweise unter Zusatz einer Thiolkomponente in reduzierter und oxidiert Form. Bevorzugte Thiolkomponenten sind z.B. Glutathion in reduzierter (GSH) und oxidiert Form (GSSG), Cysteamin und Cystamin, Cystein und Cystin oder 2-Mercaptoethanol und 2-Hydroxyethyl-disulfid. Zusatz dieser Thioleagentien in reduzierter und oxidiert Form ermöglicht sowohl die Ausbildung von Disulfidbrücken innerhalb der sich faltenden Polypeptidkette während der Naturierung als auch das Reshuffling falscher Disulfidbrücken innerhalb oder zwischen den sich faltenden Polypeptidketten (Rudolph et al. 1997, loc. cit.).

[0021] Das erfindungsgemässe Verfahren wird zweckmässig während der Naturierung bei niederen Temperaturen (vorzugsweise ca. 10 DEG C) durchgeführt. Bei dem erfindungsgemässen Verfahren wird die Renaturierung während einer Dauer von 0.5-5 h, bevorzugt von 1-2 h, durchgeführt.

[0022] Zur Verhinderung der Oxidation des Reduktionsmittels durch Luftsauerstoff und zum Schutz freier SH-Gruppen ist es zweckmässig, einen Komplexbildner, wie EDTA, vorzugsweise in einer Menge von 1-20 mM, besonders bevorzugt um ca. 10 mM zuzusetzen.

[0023] Unter der Aktivität von beta -NGF ist die biologische Aktivität von beta -NGF zu verstehen. Biologisch aktiver beta -NGF liegt als Dimer vor. Die Aktivität kann bestimmt werden nach dem DRG-Test (Dorsal Root Ganglionassay), R. Levi-Montalcini et al., Cancer Res. 14 (1954) 49 und S. Varon et al., Meth. in Neurochemistry 3 (1972) 203. Dabei wird die Stimulierbarkeit und das Überleben von sensorischen Neuronen aus dissoziierten Dorsalwurzelganglien aus Hühnerembryonen an Hand der Ausbildung von Neuriten untersucht.

[0024] Die Prosequenz stellt eine vom reifen Protein getrennte Domäne dar. Zwischen diesen

<http://www.cnn.com/cnn.com/docs?C=dl&CV=dl&ID=DDD&DND=ED0004199>

Figur 7 zeigt ein RP-HPLC-Elutionsdiagramm von rh-proNGF bei 220 nm (Säule Poros 10 R1; 100 mm x 4.6 mm; Perseptive Biosystems).

Figur 8 zeigt ein SDS-Gel (15 %, Coomassie-Färbung) der limitierten Proteolyse von rh-proNGF mit Trypsin (M: 10 kDa-Marker, 1: rh-proNGF-Standard, 2: rh- beta -NGF-Standard, 3: Masseverhältnis Trypsin : rh-proNGF= 1 : 40, 4: 1 : 100, 5: 1 : 250, 6: 1 : 500, 7: 1 : 1000, 8: 1 : 2000, 9: 1 : 2500, 10: Kontrolle ohne Trypsin, mit STI).

SEQ ID NO:1 und 2 zeigen Oligonukleotide zur Konstruktion von pET11a-proNGF.

SEQ ID NO:3 zeigt die Nukleotidsequenz der cDNA von humanem proNGF sowie die Aminosäuresequenz des Translationsprodukts.

SEQ ID NO:4 zeigt die Aminosäuresequenz des Translationsprodukts.

#### Beispiel 1

#### Klonierung der proNGF-cDNA in einen Escherichia coli-Expressionsvektor

[0026] Für die Klonierung des proNGF-Konstrukts wurde das T7-Expressionssystem von Novagen gewählt (F.W. Studier und B.A. Moffatt, J. Mol. Biol. 189, (1986) 113). Die für proNGF codierende DNA-Sequenz steht unter der Kontrolle des starken T7 Transkriptionssignals. Als Wirtstamm wird E. coli BL21 (DE3) verwendet. Das Chromosom enthält das Gen für die T7 RNAPolymerase. Die Expression dieser RNAPolymerase und damit des rh-proNGFs wird durch IPTG (Isopropyl- beta -D-thiogalactosid) induziert.

[0027] Die cDNA für humanen proNGF wurde durch PCR-Amplifikation aus dem Vektor pMGL-SIG-proNGF von Boehringer Mannheim erhalten (PL-Nr. 1905). Durch Mutageneseprimer wurde am 5'-Ende der für proNGF codierenden DNA-Sequenz eine NdeI- und am 3'-Ende eine BamHI-Schnittstelle eingeführt. Das PCR-Produkt wurde in die NdeI/BamHI-Schnittstelle der multiplen Klonierungsstelle des Vektors pET11a (Novagen) inseriert (Fig. 1).

[0028] Es wurden folgende Primer für die PCR benutzt:

#### Forward Primer

FwProNGF

:

#### Reverse Primer

RevNGF

:

[0031] Nach der Klonierung in den Vektor wurde die Nucleotidsequenz mittels DNA-Sequenzierung überprüft.

#### Beispiel 2

#### a) Expression von humanem proNGF in E. coli

[0032] Für die Anzucht des rekombinanten Bakterienstamms wurde eine Übernachtskultur bereitet. Dazu wurde ein geeignetes Volumen LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin und 50 µg/ml Kanamycin versetzt.

**LB-Medium (1 l):** 10 g Trypton,  
10 g Hefeextrakt,  
5g NaCl.

[0033] Das Medium wurde mit einer Einzelkolonie beimpft und über Nacht bei 37 DEG C geschüttelt.

[0034] Am nächsten Morgen wurde das gewünschte Volumen 2xYT-Medium mit 100  $\mu$ g/ml Ampicillin und 50  $\mu$ g/ml Kanamycin im Verhältnis 1:100 (v/v) mit der Übernachtskultur angeimpft. Die Kultur wurde bei 37 DEG C und 200-250 rpm geschüttelt, bis eine OD600 von 0.5-0.8 erreicht war. Danach wurde die Expression von proNGF mit 3 mM IPTG 4 h lang bei gleicher Temperatur induziert. Anschliessend wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet und entweder sofort aufgeschossen oder bei -70 DEG C eingefroren.

**2xYT-Medium (1 l):** 17 g Trypton,  
10 g Hefeextrakt,  
5 g NaCl.

### b) Isolierung der IBs

[0035] Das rekombinante Protein fällt in den Bakterienzellen in aggregierter Form an. Die Präparation dieser Inclusion Bodies wurde durchgeführt nach R. Rudolph et al.: Folding Proteins. In: T. E. Creighton (ed.): Protein function: A Practical Approach, pp. 57-99.

[0036] Für den Zellaufschluss wurden jeweils 5 g Zellpellet in 25 ml 100 mM Tris/HCl pH 7.0; 1 mM EDTA resuspendiert. Danach wurden 1.5 mg Lysozym pro g Zellfeuchtmasse hinzugegeben, 30 min bei 4 DEG C inkubiert und die Zellen anschliessend mit dem Gaulin-Zellaufschlussgerät aufgebrochen. Dann wurden 3 mM MgCl<sub>2</sub> sowie 10 µg/ml DNase zum Rohhomogenat gegeben und 30 min bei 25 DEG C inkubiert. Nach dem DNase-Verdau wurden die unlöslichen Zellbestandteile durch Zugabe von 0.5 Volumenanteilen 60 mM EDTA, 6% Triton X-100, 1.5 M NaCl pH 7.0 und anschliessende dreissigminütige Inkubation bei 4 DEG C solubilisiert. Die IBs wurden 10 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Sie wurden dann noch viermal mit je 100 ml 100 mM Tris/HCl pH 7.0; 20 mM EDTA gewaschen und bei -20 DEG C aufbewahrt.

[0037] Aus 10 l E. coli-Kultur (ca. 44 g Zellfeuchtmasse) wurden auf diese Weise reproduzierbar ca. 4 g IB-Pellet erhalten. Die Präparationen enthielten stets etwa 90-95% rh-proNGF (Fig. 2).

### Beispiel 3

### a) Solubilisierung der IBs

[0038] 400 mg IB-Pellet wurden in 2 ml Solubilisierungspuffer (100 mM Tris/HCl pH 8.0; 6 M GdmCl; 100 mM DTT; 10 mM EDTA) suspendiert, 2 h bei 25 DEG C inkubiert und 30 min bei 13.000 rpm im Kühlraum abzentrifugiert. Anschliessend wurde der Überstand abgenommen und mit 1 M HCl auf pH 3-4 gebracht. Das Solubilisat wurde dreimal gegen 300 ml 6 M GdmCl pH 4.0; 10 mM EDTA dialysiert, und zwar zweimal je 2 h bei 25 DEG C und einmal über Nacht im Kühlraum (12 DEG C; 16-18 h). Die Proteinkonzentration wurde dann nach der Bradford-Methode bestimmt (M. M. Bradford, Anal. Biochem. 72, 248 (1976)). Die Konzentration an rh-proNGF betrug zwischen 40 und 50 mg/ml.

### b) Optimierung der Renaturierung von rh-proNGF

**[0039] Zur Darstellung von biologisch aktivem rh-pro-NGF aus den in Beispiel 3a) hergestellten Solubilisaten wurden diese in verschiedene Renaturierungspuffer verdünnt. Zur Ermittlung der optimalen Faltungsbedingungen wurden folgende Parameter in der angegebenen Reihenfolge variiert:**

- a) Temperatur und Zeit,
- b) pH-Wert,
- c) Arginin-Konzentration,
- d) GSH/GSSG-Konzentration,
- e) GdmCl-Konzentration,
- f) Proteinkonzentration.

[0040] Die Ergebnisse sind in Tabellen 1-2 sowie Fig. 2a-f dargestellt. Die Menge an renaturiertem rh-proNGF in den Faltungsansätzen wurde mit RP-HPLC bestimmt. Dazu wurden zu bestimmten Zeiten je 925  $\mu$ l der Faltungsansätze mit 75  $\mu$ l 32%iger HCl versetzt und dadurch die Faltungsreaktion gestoppt. Für die RP-HPLC-Analytik wurde eine Poros 10 R1-HPLC-Säule und das HPLC-System Beckman Gold mit 125NM Solvent Module, 168 Detektor, Autosampler 507 und Auswertesoftware Gold V 8.10 verwendet. Die erhaltenen Elutionspeaks wurden mit dem Programm Peakfit, Version 2.01, gefittet. Zur quantitativen Bestimmung der Ausbeuten wurde eine Eichgerade mit gereinigtem, nativen rh-proNGF erstellt. Da die rh-proNGF-IBs sehr sauber waren, wurde bei der quantitativen Auswertung die zur Renaturierung eingesetzte Gesamtproteinmenge mit der von rh-proNGF gleichgesetzt. Bei den dargestellten Messergebnissen handelt es sich um Durchschnittswerte aus je zwei Messungen.

Id=Tabelle 1 Columns=4

Optimierung von Temperatur und Zeit bei der rh-pro-NGF-Faltung. Die Proteinkonzentration betrug in jedem Renaturierungsansatz 50  $\mu$ g/ml. Der Faltungspuffer bestand aus

100 mM Tris/HCl pH 9.5,

1 M L-Arginin,

5 mM GSH,

1 mM GSSG,

5 mM EDTA.

Die Messreihen wurden mehrfach durchgeführt und mit einer Exponentialfunktion gefittet. Dargestellt sind die Durchschnittsergebnisse zweier Messungen.

Head Col 1: Temperatur [ DEG C]

Head Col 2: Endausbeute [%]

Head Col 3: Plateau erreicht nach ca.

Head Col 4: Geschwindigkeitskonstante  $k$  [s]

425.83.3 h2.596 x 10 s

 $1029.01.6 \text{ h} 4.865 \times 10 \text{ s}$ 

1522.41.1 h6.399 x 10 s

2012.01.0h1.065 x 10 s

2511.40.8 h1.935 x 10 s

Id=Tabelle 2 Columns=3

Hier ist der Einfluss verschiedener GSH/GSSG (GSH = reduziertes Glutathion, GSSG = oxidiertes Glutathion) auf die Faltung von rh-pro-NGF dargestellt. Als Renaturierungspuffer wurde

100 mM Tris/HCl pH 9.5,

1 M L-Arginin,

5 mM EDTA

verwendet. Die Faltungsdauer betrug 3 h bei 10 DEG C. In der Tabelle sind die einzelnen Faltungsansätze nach abnehmender Ausbeute geordnet. Angegeben sind die durchschnittlichen Ausbeuten aus zwei Messreihen.

Head Col 1: Nr. des Ansatzes

Head Col 2: GSH/GSSG-Verhältnis [mM]

Head Col 3: Ausbeute [%]

15/0.537.7

25/135.0

35/534.0



### c) Renaturierung von rh-proNGF im präparativen Massstab

#### d) Reinigung mittels Ionenaustauschchromatographie

### Beispiel 4

### Charakterisierung von rh-proNGF

### a) Konzentrations- und Molekulargewichtsbestimmung mit UV-Spektralphotometrie

#### b) Reinheitsanalyse und Molekulargewichtsbestimmung mit SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

#### d) Reinheitsanalyse mit IEX-HPLC

[0045] 24 µg (50 µl einer Probe mit 0.48 mg/ml rh-proNGF) Protein wurden auf eine mit 50 mM Na-Phosphat pH 7.0; 1 mM EDTA äquilibrierte Poros 20 HS-Säule aufgetragen (125 x 4 mm) und bei einer Flussrate von 5 ml/min mit einem linearen Gradienten von 0 bis 100 % B (B = 50 mM Na-Phosphat pH 7.0; 2 M NaCl; 1 mM EDTA) in 10 Minuten eluiert (Fig. 6). Zur Detektion wurde die Absorption bei 280 nm benutzt (GyncoTek-HPLC-System mit Auswertesoftware Chromeleon Version 3.14).

#### e) Reinheitsanalyse mit RP-C4-HPLC

[0046] 3.1 µg rh-proNGF (15 µl rh-proNGF mit einer Konzentration von 0.21 mg/ml) wurden auf eine mit 0.13% (v/v) TFA äquilibrierte Poros 10 R1-Säule (100 mm x 4.6 mm; Perseptive Biosystems) aufgetragen. Das Protein wurde bei einer Flussrate von 0.8 ml/min mit einem nicht-linearen Gradienten innerhalb von 33 min eluiert (0-4 min: 6%B; 4-9 min: 6-30%B; 9-24 min: 30-69%B; 24-25 min: 69-100%B; 25-27 min: 100%B; 27- 30 min: 100%B). Als Laufmittel B wurde 0.1% (v/v) TFA in 80% (v/v) Acetonitril verwendet. Zur Detektion wurde die Absorption bei 220 nm herangezogen (Beckman Gold -HPLC-System mit Auswertesoftware Gold V 8.10).

). Nativer rh-proNGF eluierte in einem einzigen Peak bei einer Retentionszeit von 14.28 min (Fig. . 7).

#### f) N-terminale Sequenzanalyse

[0047] Für die N-terminale Sequenzanalyse wurden die mittels RP-HPLC grob gereinigten, solubilisierten IBs verwendet. Die N-terminale Sequenz wurde mit einem Applied Biosystems 476A Protein Sequencer bestimmt. Es wurde folgende Aminosäuresequenz erhalten:

H2N-Met-Glu-Pro-His-Ser-Glu-Ser-Asn-Val

#### g) Biologische Aktivität des rekombinanten humanen proNGF

[0048] Die physiologische Aktivität von rh-proNGF wurde mit dem DRG-Test (= dorsal root ganglion assay) überprüft (R. Levi-Montalcini, H. Meyer und V. Hamburger, Cancer Res. 14, 49 (1954); S. Varon, J. Nomura, J. R. Perez-Polo und E. M. Shooter, Meth. In Neurochemistry 3, 203 (1972)). Dabei wird die Stimulierbarkeit und das Überleben von sensorischen Neuronen aus dissoziierten Dorsalwurzelganglien von 7-8 Tage alten Hühnerembryonen anhand der Ausbildung von Neuriten untersucht. Die rh- proNGF-Probe wurde mit Kulturmedium auf Konzentrationen von 0.019 bis 20.00 ng/ml eingestellt. Es wurden 15000 Neuronen pro Testansatz eingesetzt. Nach 48-stündiger Inkubation bei 37 DEG C wurde die Zahl der überlebenden Zellen bestimmt. Als Referenz wurde eine Lösung von rh- beta -NGF mit bekannter Konzentration hinzugezogen. Bei der quantitativen Auswertung bezieht man sich auf den sogenannten EC50-Wert, d.h. derjenigen NGF-Konzentration, bei der die Hälfte aller Neuronen überleben. Für rh-proNGF ergibt sich ein EC50-Wert von 0.369 ng/ml. Im Vergleich dazu beläuft sich der EC50-Wert für den rh- beta -NGF-Standard auf 0.106 ng/ml. Berücksichtigt man die unterschiedlichen Molekulargewichte von rh- beta -NGF und rh-proNGF, so ergibt sich für reifen rh- beta -NGF eine etwa doppelt so grosse biologische Aktivität wie für rh-proNGF.

#### Beispiel 5

##### a) Gewinnung von biologisch aktivem, reifen rh- beta -NGF durch limitierte Proteolyse von rh-proNGF

[0049] Menschlicher proNGF besitzt als letzte Aminosäure der Prosequenz ein Arginin. Daher kann in vitro aus dieser Vorstufe durch limitierte Proteolyse mit Proteasen geeigneter Substratspezifität wie beispielsweise Trypsin reifer rh- beta -NGF erhalten werden.

[0050] 500 µl gereinigter rh-proNGF wurde gegen 50 mM Tris/HCl pH 8.0 dialysiert. Nach der Dialyse wurde mittels Aufnahme des UV-Spektrums eine Proteinkonzentration von 0.49 mg/ml gemessen. Pro Verdau-Ansatz wurden 20 µg proNGF eingesetzt. Davon wurden nach der Proteolyse 3 µg (entspricht 6 µl) mittels SDS-PAGE analysiert. Als Trypsin-Stammlösungen wurden 0.1 µg/ml bzw. 0.01 µg/ml verwendet. Die Konzentration des Sojabohnen-Trypsin-Inhibitors (STI) betrug 1 mg/ml. Beide Proteine lagen als Lyophilisate vor (Hersteller: Boehringer Mannheim bzw. Sigma) und wurden in obigem Puffer gelöst.

[0051] Für die limitierte Proteolyse wurden unterschiedliche Trypsin/rh-proNGF-Masseverhältnisse eingesetzt (s. Tabelle 3). Nach dreissigminütiger Inkubation auf Eis wurde die Reaktion mit je 5 µg STI abgestoppt. Als Kontrolle wurde rh-proNGF ohne Zugabe von Protease ebenfalls auf Eis inkubiert und anschliessend mit STI versetzt.

Id=Tabelle 3 Columns=5

Head Col 1: Verhältnis Trypsin:rh-proNGF

Head Col 2: m(Trypsin) [ µg ]

Head Col 3: V(Trypsin) [ µl ]

Head Col 4: V(rh-proNGF) [ µl ]

Head Col 5: V(STI) [ µl ]

1 : 400.55 (0.1 µg/ml) 405

1 : 1000.22 (0.1 µg/ml) 405

1 : 2500.080.8 (0.1 µg/ml) 405

1 : 5000.044 (0.01 µg/ml) 405

1 : 10000.022 (0.01 µg/ml) 405

1 : 20000.011 (0.01 µg/ml) 405

1 : 25000.0080.8 (0.01 µg/ml) 405

Kontrolle--202.5

#### b) Analyse der Spaltprodukte durch N-terminale Sequenzierung

[0052] Die Verdauansätze mit einem Massenverhältnis Trypsin : rh-proNGF von a) 1 : 40; b) 1 : 100 und c) 1 : 250 wurden durch N-terminale Sequenzierung näher untersucht. Bei den beiden oberen Proteinbanden in dem SDS-PAGE-Gel (Abb. 8) handelt es sich um Trypsin (24 kDa) bzw. STI (20.1 kDa). In der Bande bei 13 kDa fanden sich mehrere Spezies:

N-Terminus 1: Met....;

N-Terminus 2: Val....;

N-Terminus 3: Ser...(reifer rh- beta -NGF);

N-Terminus 4: Gly....

[0053] Diese Peptide waren in den verschiedenen Ansätzen in unterschiedlichem Ausmass vorhanden.

Ansatz a): N-Terminus 2 : N-Terminus 3 : N-Terminus 4 = 4 : 5 : 2.

Ansatz b): N-Terminus 2 : N-Terminus 3 = 1 : 1; N-Terminus 4 in Spuren.

[0054] Ansatz c) wurde zusätzlich mittels RP-C3-HPLC analysiert (Säule: Nucleosil 500-5 C3-PPN; 125mm x 4 mm). Dabei fanden sich zwei Peaks: Peak 1 (12.32 min): N-Terminus 1; Peak 2 (14.88 min): N-Terminus 2 und N-Terminus 3 im Verhältnis 2 : 3.

[0055] Zur Gewinnung von maturem rh- beta -NGF aus rh-proNGF im präparativen Massstab wurden 1.3 mg rh-proNGF (in 50 mM Tris/HCl pH 8.0; Konzentration 0.46 mg/ml) im Masseverhältnis 1:250 (Trypsin : rh-proNGF) mit Trypsin versetzt. Der Ansatz wurde 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurde die Protease mit einem 40-fachen Masseüberschuss an Sojabohnen-Trypsininhibitor deaktiviert. Der Spaltansatz wurde gegen 50 mM Natriumphosphat pH 7.0; 1 mM EDTA dialysiert und anschliessend auf eine Kationen-Austauschersäule (1.7 ml Poros 20 HS; Perseptive Biosystems) aufgetragen. Das Spaltprodukt eluierte in einem einzigen Peak in einem linearen Salzgradienten von 0 bis 2 M NaCl. Die Elution bei einer Salzkonzentration von etwa 840 mM NaCl entsprach derjenigen von maturem rh- beta -NGF in einem Kontrollexperiment. Die Ausbeute an gereinigtem Spaltprodukt betrug 17%.

[0056] Die biologische Aktivität des gereinigten Spaltprodukts wurde mittels DRG-Assay getestet. Diese stimmte mit der Aktivität von reifem rh- beta -NGF überein (Tab. 4).  
Id=Tabelle 4 Columns=2

Head Col 1: Spezies

Head Col 2: EC50-Wert [pg/ml]

rh- beta -NGF110

rh- beta -NGF, hergestellt durch limitierte Proteolyse von rh-proNGF171

#### Referenzliste

- Barnett, J. et al., J. Neurochem. 57 (1991) 1052  
Bradford, M. M., Anal. Biochem. 72 (1976) 248  
EP-A 0 544 293  
Hefti, F. J., J. Neurobiol. 25, (1994) 1418  
Hill, S. C. und von Nippel, P., Anal. Biochem. 182 (1989) 319  
Laemmli, U. K., Nature 227 (1970) 680  
Levi-Montalcini, R., et al., Cancer Res. 14 (1954) 49  
Levi-Montalcini, R., Science 237 (1987) 1154  
Marston, F.A., Biochem. J. 240 (1986) 1 - 12  
Nesterenko, M. V. et al, J. Biochem. Biophys. Methods 28 (1994) 239  
Rudolph, R. et al. (1997): Folding Proteins. In: T. E. Creighton (ed.): Protein function: A Practical Approach, pp. 57-99  
Schmelzer, C. H. et al., J. Neurochem. 59 (1992) 1675  
Studier, F.W. et al, J. Mol. Biol. 189 (1986) 113  
Suter, U. et al., EMBO J. 10 (1991) 2395  
SWISS-PROT Protein Sequence Database No. P01138  
Thoenen, H. et al, Physiol. Rev. 60 (1980) 1284  
Ullrich, A., et al., Nature 303 (1983) 821  
US-Patent 5,235,043  
US-Patent 5,593,856  
US-Patent 5,606,031  
US-Patent 5,683,894  
Varon, S. et al., Meth. in Neurochemistry 3 (1972) 203  
WO 97/47735  
Yankner, B. A., et al., Annu. Rev. Biochem. 51 (1982) 845

---

Data fra esp@cenet test databasen - l2